



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS MADRE  
EN LA ENFERMEDAD CRÓNICA HEPÁTICA**

Autor: GUILLERMO E. PÉREZ ROPERO

D.N.I.:53989773X

Tutor: Aránzazu Sánchez

Convocatoria: JUNIO 2016

## ÍNDICE

1.-RESUMEN .....	2
2.- INTRODUCCIÓN .....	2
3.-MATERIAL Y METODOS .....	4
4.-RESULTADOS .....	5
4.1.- REPROGRAMACIÓN CELULAR Y DIFERENCIACIÓN DE iPSCs A HEPATOCITOS .....	5
4.2.- REGENERACIÓN HEPÁTICA TRAS EL TRASPLANTE DE HEPATOCITOS PROCEDENTES DE iPSC .....	7
4.3.-APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE LAS iPSC EN TERAPIA GÉNICA DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS. ....	9
4.4.-HÍGADOS BIOARTIFICIALES E HÍGADOS <i>IN VITRO</i> .....	10
4.4.1.-HÍGADOS BIOARTIFICIALES.....	11
4.4.2.-INGENIERÍA DE TEJIDOS: HÍGADOS <i>IN VITRO</i> .....	11
4.5.-CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN CARCINOMA HEPÁTICO .....	12
6.- DISCUSIÓN .....	14
7.-CONCLUSIÓN.....	16
8.-BIBLIOGRAFÍA.....	16

## **1.-RESUMEN**

En la búsqueda de alternativas frente al trasplante hepático como solución a determinadas enfermedades hepáticas crónicas, encontramos que las células madre, sobre todo las MSC y las iPSC, están siendo ampliamente estudiadas.

Las iPSC sirven como fuente para generar hepatocitos que posteriormente podrán ser trasplantados directamente al hígado o utilizados en la generación de órganos *in vitro* o de órganos bioartificiales (BAL). Esto les permite ser usadas tanto en regeneración hepática tras infecciones o lesiones como en enfermedades de origen genético.

Las MSC han sido superadas en muchos aspectos por las iPSC, pero continúa siendo estudiado su papel en relación al carcinoma hepático, donde podrían desarrollar un importante papel en la inmunomodulación.

## **2.- INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades hepáticas suponen una importante causa de muerte a nivel mundial, resaltando la cirrosis (duodécima causa de muerte,) y el hepatocarcinoma (decimosexta causa de muerte), siendo la mayoría de los casos debidos a enfermedades infecciosas, principalmente en países en vías de desarrollo<sup>(1)(2)</sup>. A día de hoy la única solución efectiva en estados avanzados de estos trastornos es el trasplante hepático. Este tratamiento conlleva una elevada morbilidad y un elevado coste económico para los sistemas sanitarios, resultando además insuficiente para curar a todos los enfermos debido a la escasez de donantes y al posible rechazo<sup>(3)</sup>.

Desde los años 60 se empezaron a probar nuevas estrategias centradas en el trasplante de hepatocitos, tanto autólogos (los hepatocitos trasplantados se obtienen del propio paciente) como xenotrasplantes (los hepatocitos trasplantados en este caso se obtienen de individuos de otras especies)<sup>(4)</sup>. Estas nuevas técnicas celulares se enfrentaron a diversos problemas, por un lado, los hepatocitos porcinos (xenotrasplantes) daban lugar al desarrollo de una respuesta inmunitaria y no eran capaces de mimetizar totalmente las funciones de un hepatocito humano. Por otra parte, el uso de cultivos de hepatocitos *in vitro* demostró dificultades, como una difícil conservación en frío (criogenización)<sup>(5)</sup>, a lo que se sumaba, en

aquellos hepatocitos procedentes de células tumorales, un déficit de funcionalidad puesto de manifiesto en la incapacidad de llevar a cabo el ciclo de la urea<sup>(6)</sup>. Estas dificultades en la generación de hepatocitos viables se resolvieron parcialmente mediante el uso de células madre como posible terapia alternativa, al resultar menos invasiva, más barata y ser poco inmunogénica, debido esto último a que la fuente de estas células era el propio paciente. Las más estudiadas hasta el momento son las células madre hematopoyéticas (HSC) y las células madre mesenquimales (MSC). Ambas han demostrado cierta eficacia en modelos animales con daño hepático, tanto agudo como crónico, presentando capacidad regeneradora e inmunomoduladora<sup>(7)(8)</sup>. Por otro lado tenemos las células madre embrionarias, aunque las implicaciones éticas de su uso complican su aplicación más allá del campo investigador<sup>(9)</sup>.

En relación al carcinoma hepático los resultados obtenidos son muy variables, no pudiendo confirmarse si la terapia celular con MSC supone una mejora o tiene potencial para agravar un posible hepatocarcinoma, en parte debido a la dificultad para dirigir eficazmente a estas células hacia una localización concreta <sup>(10)</sup>.

Frente a estos linajes celulares se ha comenzado a investigar recientemente el posible papel de las células madre pluripotentes inducidas (iPSC), que presentan una mejor capacidad proliferativa y se pueden obtener desde una gran variedad de tipos celulares mediante técnicas de reprogramación génica<sup>(11)</sup>. Se ha demostrado que las iPSC retienen información génica de sus células de procedencia, lo que sugiere que dependiendo de sus células de procedencia las iPSC tendrán una capacidad de diferenciación u otra<sup>(12)</sup>.

Para obtener iPSC humanas, las células adultas que mejores resultados han dado son los fibroblastos de la piel. Esto representa un gran avance al no requerirse un método invasivo para la obtención de las células, siendo suficiente con una biopsia de la piel. Una vez obtenidos los fibroblastos, estos son tratados acorde a los protocolos establecidos para conseguir su reprogramación a células pluripotentes, y su posterior diferenciación hacia hepatocitos<sup>(13)</sup>. Se aplicaron para su reprogramación diferentes factores de transcripción, resaltando Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), Sox2 (sex-determining region Y box 2), Klf4 (Kruppel-like factor 4) y c-Myc. (OSKM). Para su diferenciación, se utilizaron los protocolos que previamente se habían aplicado en la diferenciación de células madre del endodermo (ESC). A día de hoy aún se están perfeccionando las técnicas de diferenciación, pues aún no se ha establecido ninguna capaz de generar células completamente equivalentes a los hepatocitos primarios<sup>(14)</sup>. En los métodos empleados actualmente, se intenta imitar el

desarrollo embriológico natural, recreando las señales moleculares y celulares que se dan en cada fase de este proceso.

Una vez finalizado el proceso de diferenciación, para asegurar que los hepatocitos derivados de iPSC obtenidos sean los deseados, se comprueba la presencia de marcadores de diferenciación específicos de los hepatocitos, como son la capacidad de secreción de albumina (ALB), de alfa-fetoproteína (AFP), de alfa1-antitripsina (AAT), de urea, también la expresión de determinadas proteínas y la del CYP450 en sus isoformas CYP3A4 y CYP3A7.

Los hepatocitos producidos podrán ser trasplantados directamente en el organismo para promover la regeneración hepática, así como utilizarse en la creación de hígados bioartificiales (BAL), suponiendo ambas técnicas una alternativa al tratamiento habitual de trasplante hepático <sup>(15)</sup>.

En resumen y teniendo en cuenta los últimos avances en el campo de la terapia celular, recogeremos el posible papel futuro de las células madre, especialmente de las iPSC, en el tratamiento de las enfermedades crónicas hepáticas, resaltando la cirrosis y el carcinoma hepático.

### **3.-MATERIAL Y METODOS**

Se realizó una búsqueda sistemática de revisiones bibliográficas así como de estudios científicos. Se llevó a cabo esta búsqueda en inglés a través de Pubmed utilizando como palabras o expresiones clave: iPSC, "induced pluripotent stem cells", "liver", "hepatocyte differentiation", "iPSC derived hepatocytes" "reprogramming". Pubmed es una herramienta de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE dónde encontramos citaciones, resúmenes y artículos de investigación biomédica. En cuanto a los criterios de inclusión, hemos tratado de seleccionar artículos con investigaciones del 2010 en adelante, que se centren en el estudio de células humanas como fuente de producción de iPSC, así como su estudio en modelos animales con daño hepático crónico, principalmente en ratones.

#### 4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las iPSC representan una innovadora fuente de células útiles en medicina regenerativa, ya que pueden reprogramarse y posteriormente diferenciarse hacia cualquier tipo de célula adulta madura, como es el caso de los hepatocitos, pudiendo ser utilizados en terapia celular, ingeniería de tejidos y creación de hígados bioartificiales<sup>(16)</sup>.

##### 4.1.- REPROGRAMACIÓN CELULAR Y DIFERENCIACIÓN DE iPSCs A HEPATOCITOS

Los factores de transcripción requeridos según el grupo de Takahashy et al para la reprogramación celular hacia células pluripotentes eran 4 (OKSM): Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Actualmente se han dejado de usar los factores de transcripción c-Myc y Klf4, que a pesar de estar presentes en la embriogénesis, elevaban el riesgo de producir un tumor según Thomson et al, y por ello han sido sustituidos por Nanog y Lin28<sup>(17)</sup>. En relación a minimizar el riesgo de desarrollo tumoral derivado del uso de vectores virales se está investigando el empleo de microRNA<sup>(18)</sup>.

Una vez obtenidas las iPSC son sometidas a una serie de pruebas con el fin de caracterizarlas y garantizar el éxito del proceso de reprogramación. Se lleva a cabo un test de pluripotencia, que comprende el test de la fosfatasa alcalina así como un test de detección de marcadores (como mínimo Oct4, Nanog, Sox2, SSEA3, SSEA4, Tra-1- 60, Tra-1-81), un test de diferenciación in vitro, con el fin de detectar las tres capas germinales mediante inmunocitoquímica, un cariotipo y un test con el fin de identificar la huella genética mediante el análisis de microsatélites <sup>(19)</sup>.

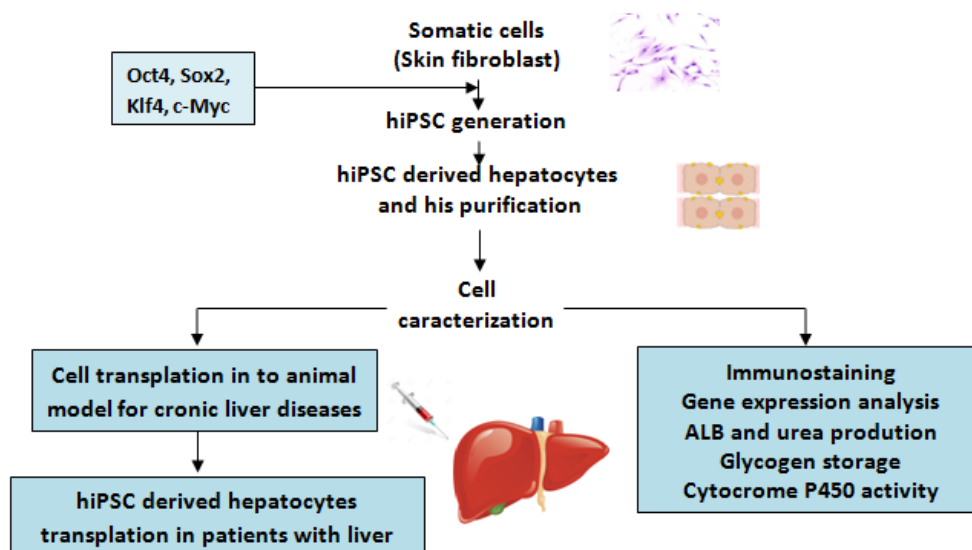


Figura 1: Esquema de obtención de hepatocitos desde fibroblastos. Subba Rao M et al (2013)

Los primeros protocolos creados para diferenciar ESC *in vitro* hacia distintos tipos celulares, también aplicables a la diferenciación de iPSC, estaban basados en observaciones hechas por biólogos durante el estudio del desarrollo embriológico natural y del mismo modo se definieron las condiciones de cultivo. En estos manuales se recogen 4 estadios: inducción al endodermo, especificación hepática, expansión hepatoblástica y maduración hepática; a estas fases llegamos mediante la administración de varios factores de crecimiento en un orden determinado y con el uso de factores de transcripción <sup>(20)</sup>.

La primera aproximación a la producción de hepatocitos funcionales fue la producción de células del endodermo, que son las células embrionarias a partir de las cuales se desarrollan los hepatocitos. En esta fase de inducción al endodermo se requiere la expresión de activina A, que solo se expresa cuando la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) está suprimida. También requiere la señalización de la proteína Wnt3a (Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 3), así como la de FGF (Fibroblast Growth Factor)<sup>(21)</sup>. Ha sido demostrado que la inhibición de la glucógeno sintasa 3-quinasa (GSK-3) es también importante en la formación definitiva del endodermo. Además hay pequeñas moléculas cuya presencia es definitiva para el desarrollo del endodermo, las dos más eficientes son el ácido benzoico y el oxoheptanoico<sup>(14)</sup>. En esta fase las células expresan SOX17 (SRY (Sex Determining Region Y)-Box 17) y FOXA2 (Forkhead Box A2), que son marcadores del endodermo, del mismo modo aún quedan células que expresan el marcador de pluripotencia Oct4<sup>(22)</sup>.

Se ha postulado que la inhibición de la ruta de señalización de p53 previene la apoptosis, senescencia y la detención del ciclo celular incrementando por tanto la eficiencia de la reprogramación, favoreciendo la fase de especificación hepatoblástica<sup>(14)</sup>. Además en esta fase las células son tratadas con HGF (Hepatocyte Growth Factor) y con DMSO (dimetilsulfoxido), lo que produce un aumento de la proliferación y contribuye a su vez en la expansión hepatoblástica<sup>(22)</sup>.

Finalmente la fase de maduración hepática se alcanza con el tratamiento de las células con dexametasona, tras lo cual comenzamos a apreciar marcadores hepáticos como ALB , AFP y AAT <sup>22)</sup>.

Por otro lado la matriz extracelular (ECM) se considera otro importante factor para la diferenciación de las iPSC a hepatocitos. A su vez la ECM es órgano- específica, es decir es diferente en cada órgano o tejido, por ello se la considera un importante órgano-

modulador<sup>(23)</sup>. El mecanismo a través del cual la ECM interviene en la diferenciación de las iPSC es aun un misterio, solo se conoce que es a través de la interacción con las integrinas  $\alpha$ -6 y  $\beta$ -1, por lo que es un campo de estudio abierto todavía<sup>(14)</sup>.

#### 4.2.- REGENERACIÓN HEPÁTICA TRAS EL TRASPLANTE DE HEPATOCITOS PROCEDENTES DE iPSC

Las enfermedades crónicas hepáticas así como el fallo hepático agudo suponen una merma de las funciones hepáticas que en un alto porcentaje sólo puede ser revertida mediante el trasplante de un nuevo hígado<sup>(24)</sup>. Es por ello que se han investigado y desarrollado nuevas técnicas para tratar esta patología, como es el trasplante de hepatocitos de diversas procedencias, especialmente los generados a partir de iPSC humanas (hiPSC).

Uno de los últimos estudios realizados con hiPSC en roedores, ha demostrado una buena capacidad de éstas para ser integradas en un hígado dañado, desarrollando microvasculatura y siendo capaces de segregar factores como el HGF, en una cantidad similar a la de los hepatocitos derivados de BMSC (Bone Marrow Stem Cell), que permiten promover la regeneración hepática y su funcionalidad<sup>(25)</sup>. Esto ha quedado demostrado con el sometimiento a diversas pruebas de estrés con CCL4, habiéndose observándose una disminución de la letalidad en comparación a hígados dañados que no recibieron hiPSC<sup>(26)</sup>.

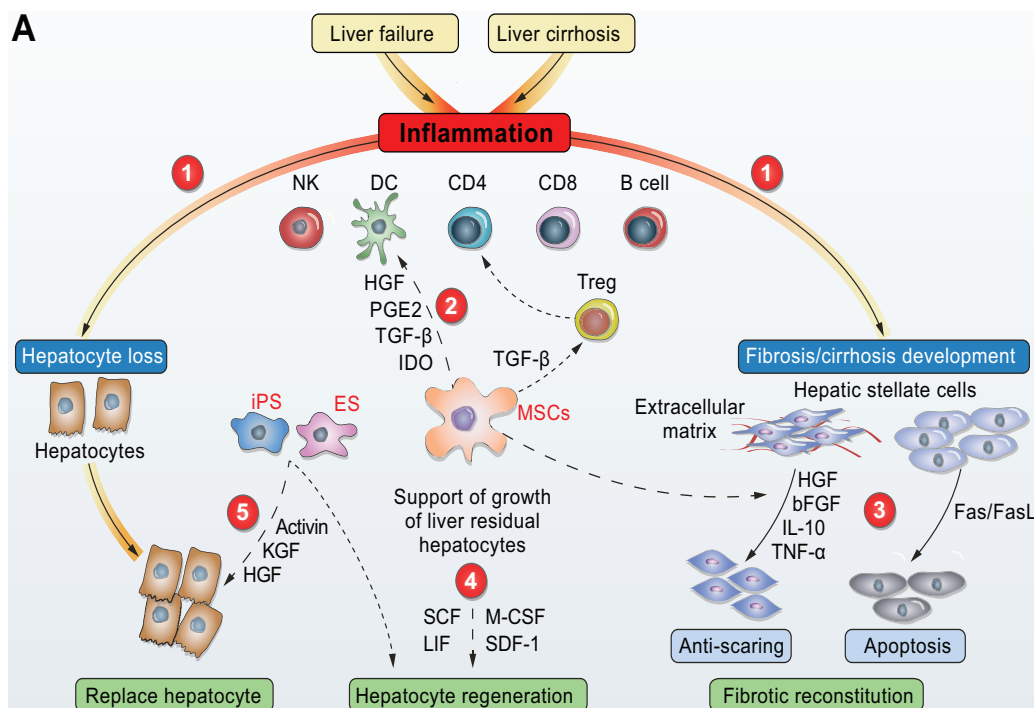


Figura 2: Papel de las células madre en situaciones de daño hepático. Zhang Z et al (2013)



Una de las claves de este estudio reside en el método de implantación celular, habiéndose empleado una lámina de hepatocitos, que fue depositada en la superficie hepática, en vez del habitual método intraesplénico (consistente en la inyección de una suspensión celular a través del bazo). En comparación con éste se observó una mejor implantación (monitorizada por la intensidad en la expresión de luciferasa, inducida mediante la introducción de un vector de expresión) y una ausencia de hepatocitos en localizaciones extrahepáticas, que es uno de los principales inconvenientes de la administración de células esplénicamente. La monitorización de la ausencia de hepatocitos se realizó mediante el análisis de DNA de diferentes localizaciones, amplificándose los fragmentos *c-mos* (ratón) y *Alu* (humano), localizándose este último únicamente en el hígado.

El método de implantación también resultó clave en la supervivencia demostrada tras las pruebas de letalidad con CCl<sub>4</sub>. Los resultados de estas pruebas señalaron una mayor tasa de supervivencia en los ratones que recibieron las células en lámina (63,2%), frente a los ratones que las recibieron por vía intraesplénica (33,3%) y los controles (16,7%). Además, tras un análisis histológico de los diferentes hígados según el proceso de implantación seguido, se observó una mayor incidencia de necrosis en los animales que recibieron el trasplante vía esplénica. Esto sin duda confirma la importancia del método de administración en relación a los resultados de regeneración obtenidos y a la prevención de posibles efectos adversos.

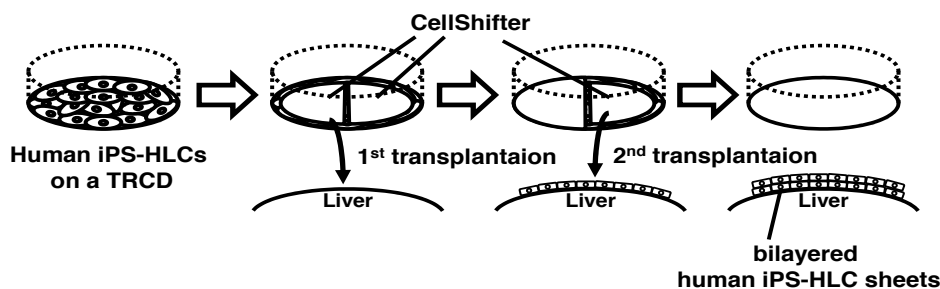


Figura 3: Técnica de cultivo en lámina para posterior trasplante. Nagamoto Y et al (2016)

La capacidad regeneradora presentada por las iPSC puede verse potenciada si se aplican junto a células madre mesenquimales en enfermedad crónica hepática. En esta patología, caracterizada por un proceso inflamatorio en el que la arquitectura hepática es distorsionada y se produce muerte celular, es de vital importancia acompañar a los procesos de regeneración de procesos de inmunomodulación. Es ahí donde las MSC han demostrado una gran eficacia al inhibir los linfocitos NK, B y T, así como impidiendo la maduración y diferenciación de las células dendríticas (presentadoras de antígenos)<sup>(27)(28)</sup>. Para la

aplicación humana, se han construido bibliotecas de líneas celulares con genotipos seleccionados conocidos, proporcionando a los pacientes con MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) cercano o similar, que puedan minimizar la necesidad de inmunosupresión para lograr el injerto de las células<sup>(15)</sup>.

Recientemente, se ha demostrado que las iPSC derivadas de hepatocitos pueden restaurar la función hepática en modelos animales con insuficiencia hepática (inducida mediante hepatectomía)<sup>(26)</sup>. Estos resultados indican una alternativa de tratamiento para los pacientes con enfermedad hepática en fase terminal.

En el caso de la cirrosis la estrategia terapéutica también puede basarse en la sustitución de hepatocitos dañados o la regeneración de estos junto con la corrección de la fibrogénesis desequilibrada que se produce en esta patología. Los informes sugieren que hepatocitos diferenciados a partir de iPSC han mejorado la regeneración del hígado en ratones<sup>(27)</sup>, han reducido la fibrosis hepática en un modelo de ratón<sup>(28)</sup>, y favorecieron la estabilización de la cirrosis (por efectos derivados de la repoblación del hígado por hepatocitos)<sup>(29)</sup>.

Las principales limitaciones en el uso de las iPSC en medicina regenerativa radican en el bajo rendimiento del proceso de reprogramación genética<sup>(30)</sup>, la duración de este proceso (entre 12-20 días)<sup>(31)</sup>, las dificultades en la purificación<sup>(32)</sup> así como en la integración específica al lugar indicado y no en localizaciones no deseadas<sup>(33)</sup>. Esto, unido a la posibilidad de una desdiferenciación previa al trasplante y a la necesidad de más estudios sobre la memoria genética de las iPSC supone un freno para su aplicación clínica en el campo de la medicina regenerativa<sup>(34)(35)</sup>.

#### **4.3.-APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE LAS iPSC EN TERAPIA GÉNICA DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS.**

Diferentes estudios se han centrado en el potencial uso de los hepatocitos derivados de hiPSC en enfermedades hepáticas innatas como pueden ser la deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina, la hipercolesterolemia familiar, la enfermedad de almacenamiento de glucógeno Tipo 1a, la tirosinemia hereditaria, el síndrome de Crigler-Najjar y el déficit en el factor VII<sup>(36)</sup>. Estas enfermedades, cuya única posibilidad de curación pasa por una modificación de la expresión génica, suponen un campo atractivo para el empleo de iPSC.

En este caso las iPSC tendrían que ser modificadas genéticamente para soslayar el defecto heredado, empleando tecnologías de edición genómica mediante nucleasas de zinc<sup>(37)</sup>. Una vez

que, a partir de células del paciente conseguimos hepatocitos sanos, estos podrían ser empleados en la generación de órganos *in vitro* para un posterior trasplante<sup>(38)</sup>, en su implantación directa en el hígado o en la creación de hígados bioartificiales extracorpóreos<sup>(39)</sup>. Diferentes estudios han demostrado resultados prometedores en roedores, consiguiendo mejorar la actividad de aquellos procesos celulares afectados por la patología heredada.

Uno de los estudios analizados realizó una comparación entre el uso de hepatocitos normales y hepatocitos obtenidos a través de iPSC en el tratamiento de la hemofilia B en ratones. La obtención de los hepatocitos a partir de iPSC se hizo a partir de protocolos establecidos, validándose a su vez la implantación de estos en el hígado. La efectividad de los diferentes tratamientos se valoró en función de la mejora de los tiempos de protrombina, medidos mediante tromboelastografía. Los tiempos obtenidos fueron significativamente mejores en ratones tratados con iPSC, observándose un aumento de la actividad del factor IX de entre un 2 y un 3% a las 4 semanas tras la implantación. En comparación a los tratamientos actuales para la hemofilia B, como puede ser la terapia de reemplazamiento del factor IX, el empleo de hepatocitos de iPSC supone un menor coste, una menor incidencia de eventos hemorrágicos futuros y un menor riesgo de anafilaxis<sup>(40)</sup>.

#### **4.4.-HÍGADOS BIOARTIFICIALES E HÍGADOS *IN VITRO***

Denominamos hígado bioartificial (BAL) a un dispositivo extracorpóreo, compuesto por células hepáticas, que es utilizado en casos de insuficiencia hepática aguda a fin de suplir parcialmente las funciones del hígado dañado<sup>(41)</sup>. Estos dispositivos no son capaces de sustituir totalmente la función hepática, y se suelen usar como medida paliativa en espera a un trasplante.

Es importante diferenciar los diferentes BAL de lo que sería un hígado *in vitro*. El término hígado *in vitro* hace referencia a una línea de investigación actual, encuadrada dentro de la ingeniería de tejidos, en la que se busca desarrollar hígados a partir de células madre del paciente, normalmente sobre una matriz decelularizada, con el fin de poder usarlos para un trasplante posterior o para el estudio de una patología determinada.

#### **4.4.1.-HÍGADOS BIOARTIFICIALES**

Ante un daño hepático agudo, se produce una insuficiencia metabólica. Esta situación se caracteriza por un aumento de la concentración de sustancias de desecho, así como de una incapacidad progresiva del organismo para mantener una homeostasis adecuada. La acumulación de desechos fue solucionada en un principio mediante la utilización de soportes extrahepáticos no biológicos, que recibían el nombre de “diálisis extrahepática”. Estos métodos presentaban una cierta eficacia en la eliminación de sustancias tóxicas, pero eran incapaces de restaurar las funciones metabólicas perdidas, entre las que resaltan la ureogénesis, detoxificación enzimática, síntesis proteica, gluconeogénesis y la inmunomodulación.

Ante esta problemática surgieron los BAL. Estos dispositivos están compuestos por una serie de cartuchos con fibras huecas donde se sitúan los hepatocitos. Los cartuchos están diseñados para maximizar la superficie de células expuestas al plasma del paciente, permitiendo una disposición en 3D que facilita el crecimiento de los hepatocitos. Estos sistemas bioartificiales se encuentran actualmente en uso clínico, usando diferentes fuentes celulares, desde hepatocitos porcinos a líneas celulares. El principal sistema usado es el HepatAssist (Alliqua Inc., Langhorne, PA, USA), formado por células porcinas criopreservadas puestas en contacto con el plasma a través de una membrana microporosa, impidiendo de esta manera que se produzcan reacciones inmunitarias. Otros dispositivos usados serían el ELAD (Vital Therapies Inc., San Diego, USA), que usa células de hepatoblastoma C3A, y con eficacia probada reduciendo los niveles de amonio y bilirrubina en casos de encefalopatía hepática. Otros dispositivos menos usados son el AMC-BAL (Academic Medical Center, Amsterdam, NL) y el MELS (Charité, Berlin, GE)<sup>(42)</sup>.

#### **4.4.2.-INGENIERÍA DE TEJIDOS: HÍGADOS *IN VITRO***

Las principales investigaciones dirigidas a la producción de órganos *in vitro* para ser trasplantados se centran en la implantación de diferentes tipos celulares sobre una matriz que permita una disposición lo más similar posible a la que encontramos en un organismo. Para obtener estas matrices se aplican técnicas de descelularización o de impresión 3D (*bioprinting*).

En las técnicas de descelularización, las células del órgano (en este caso el hígado) son eliminadas mediante la perfusión de una mezcla de detergentes alcalinos y agentes enzimáticos, que eliminan cualquier resto celular que pueda provocar una respuesta

inmunitaria. Esto es de suma importancia para iniciar posteriormente el cultivo de diferentes tipos celulares sobre la matriz<sup>(43)</sup>. Una vez obtenida la matriz extracelular, normalmente a partir de hígado de cerdo, se procede a iniciar la recelularización.

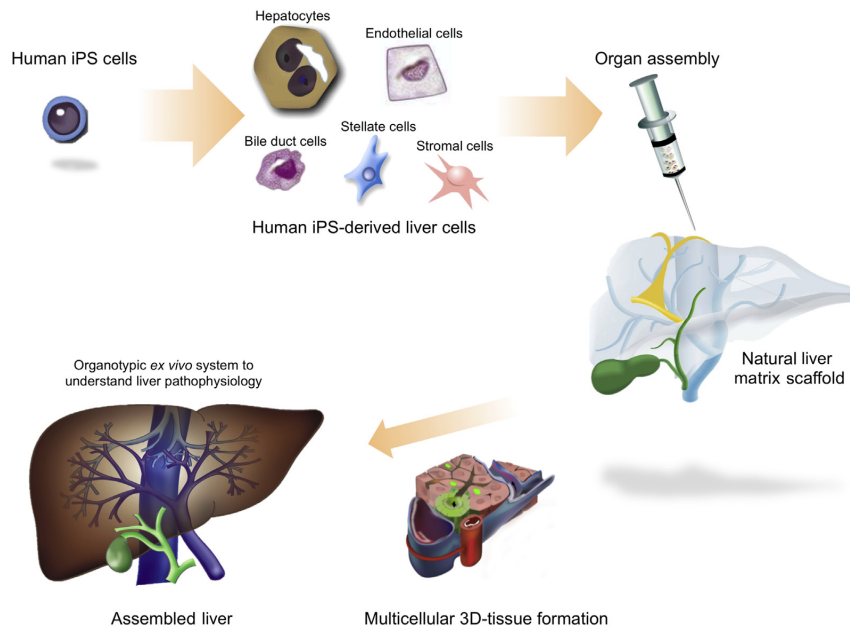


Figura 4: Generación de hígados in vitro. *Handa K et al (2014)*

La importancia de las iPSC radica en su capacidad para diferenciarse en diferentes células hepáticas según sea sometido a la acción de diferentes precursores. Es por esto que son utilizadas para generar hepatocitos, células endoteliales, células epiteliales del ducto biliar y células estrelladas. Estas células son implantadas en la matriz, dentro de un biorreactor en el medio adecuado, y tras un tiempo se obtiene una estructura tisular en tres dimensiones. Actualmente las mayores complicaciones se centran en este punto, debido a la dificultad para conseguir órganos *in vitro* de manera estandarizada y que alcancen unos niveles mínimos de actividad bioquímica, como para suplir a un hígado normal<sup>(44)</sup>.

#### 4.5.-CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN CARCINOMA HEPÁTICO

Las iPSC han demostrado tener un futuro prometedor en el tratamiento de las enfermedades crónicas hepáticas, desplazando a las MSC en multitud de aplicaciones. Sin embargo, en el tratamiento de una de las complicaciones más frecuentes de las enfermedades hepáticas, como es el hepatocarcinoma, las MSC siguen representando una futura opción terapéutica, a pesar de la polémica al respecto.

El microambiente tisular hepático tiene una amplia influencia en el desarrollo tumoral, favoreciendo especialmente la metástasis de tumores colorrectales, pancreáticos o esofágicos. El papel de las MSC frente a un carcinoma radica en su capacidad para migrar. La migración hacia la zona afectada por el tumor ha sido descrita debido a la presencia de receptores de citoquinas y TLR en la superficie de las células madres mesenquimales. Estos receptores interactuarían con diferentes sustancias secretadas por el tumor, resaltando HGF, SDF-1 (Steroidogenic factor-1), b-FGF, VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) y VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Protein 1).

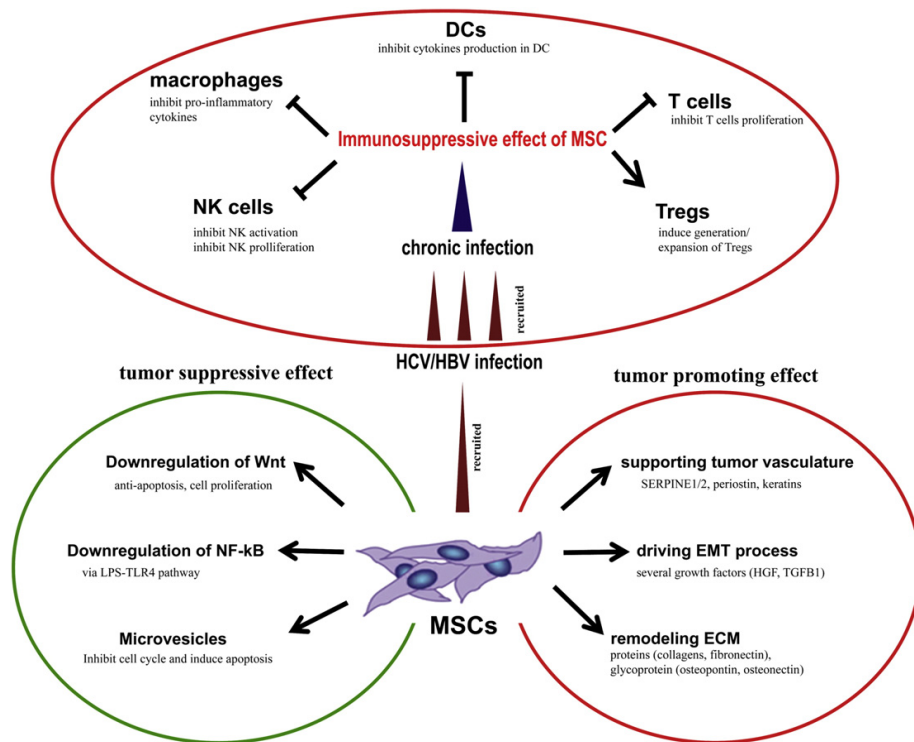


Figura 5: Acciones de las MSC en tumores hepáticos. *Hernanda PY et al (2014)*

Diferentes corrientes científicas defienden actualmente un papel dual de las MSC en el carcinoma hepático, promoviendo o inhibiendo el crecimiento tumoral. Por un lado fueron clasificadas según la expresión de TLR4 (Toll-like Receptor 4, proinflamatorio, atenúa el crecimiento tumoral y disminuye las metástasis) o TLR3 (inmunosupresivo, incrementando el crecimiento tumoral y la metástasis). Otra corriente defiende que las MSC favorecen el crecimiento tumoral al ser co-inyectadas junto a las células tumorales, o inhiben el crecimiento tumoral al ser administradas en tumores establecidos<sup>(45)</sup>.

Entre los mecanismos implicados en la inhibición tumoral se han descrito la regulación de la vía de señalización Wnt, favoreciendo la apoptosis, la regulación de la vía NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), clave en el inicio de procesos tumorales y la secreción de microvesículas con capacidad para detener el ciclo celular y producir apoptosis en las células tumorales.

Por otra parte nos encontramos con que las MSC pueden favorecer en ciertos casos el avance de los tumores, favoreciendo la creación de vasculatura en el tumor (implicando principalmente a las proteasas SERPINE) y la remodelación de la matriz extracelular.

Esta dualidad en las posibles acciones de las MSC hace muy difícil establecer una indicación terapéutica clara para su uso en un futuro cercano, siendo necesarias nuevas investigaciones<sup>(46)</sup>.

## **6.- DISCUSIÓN**

Las terapias celulares tiene un enorme potencial como tratamiento de patologías tradicionalmente crónicas y con un gran número de complicaciones, como son las principales hepatopatías, ya sea empleándolas directamente (en forma de trasplante) o de manera indirecta (en la obtención de órganos o dispositivos bioartificiales).

Una de las principales fuentes de células madre hepáticas, así como de hepatocitos, son las denominadas iPSC. Estas células, que pueden ser obtenidas de forma poco invasiva y que, al provenir del propio paciente no presentan inmunogenicidad, centran hoy en día un gran número de estudios acerca de su posible viabilidad en aplicaciones clínicas. Como posibles inconvenientes, las iPSC presentan una mayor posibilidad de tumorigénesis principalmente debido a los vectores, normalmente víricos, empleados en su obtención, estudiándose así mismo posibles alteraciones genómicas en estas células que puedan llevar a alteraciones en la memoria epigenética.

Frente a este tipo celular, encontramos a las MSC, que han sido estudiadas más extensamente e incluso probadas en diferentes ensayos clínicos, obteniéndose resultados contradictorios. Sin embargo, las principales ventajas de las iPSC frente a las células madres mesenquimales radican en su mayor capacidad para diferenciarse en diferentes linajes celulares y en su utilidad como modelo para el estudio de diferentes enfermedades (principalmente genéticas) y el potencial tóxico de los medicamentos. Estos estudios se realizan sobre cultivos celulares u

órganos *in vitro* cuyas características genéticas son idénticas a los del paciente y que son obtenidos a partir de iPSC.

La aplicación de células iPSC en el tratamiento de patologías hepáticas mediante administración directa en el lugar de la lesión ha demostrado un mayor porcentaje de implantación y supervivencia respecto a la introducción por vía intraesplénica, reduciendo el número de células que proliferan en localizaciones extrahepáticas. Aún así, sigue siendo necesario el desarrollo de un método que permita que las células trasplantadas sean capaces de actuar en el foco de la lesión de manera específica, sobre todo cuando se trata de localizaciones de difícil acceso quirúrgico, en las que la implantación puede no ser posible. En el campo de la regeneración siguen siendo necesario la realización de estudios a largo plazo, que permitan determinar de manera fiable la posibilidad de desarrollo de tumores, ya que en el proceso de reprogramación se emplean factores de transcripción relacionados con mecanismos de regulación tanto del crecimiento como de la proliferación.

Uno de los campos donde más estudios se han realizado acerca del posible papel de las iPSC es en el de las enfermedades metabólicas de origen genético. En estas enfermedades, debidas normalmente a la actividad disminuida o ausencia de una enzima, las células madres pueden jugar un importante papel, ya que no es necesaria la implantación de un gran número de células. Esto se debe a que en muchas de estas patologías una pequeña recuperación de la actividad enzimática produce un cambio significativo en la sintomatología, como quedó demostrado en un estudio llevado a cabo por la Universidad de Lovaina en el año 2014, en el que se procedió al tratamiento con MSC de niños con la enfermedad de Crygler-Najjar, caracterizada por un mal funcionamiento del ciclo de la urea, obteniéndose resultados prometedores.

En pacientes con un deterioro avanzado en la función hepática y que se encuentran en espera para un trasplante se suelen utilizar los denominados BAL, o hígados bioartificiales. Estos dispositivos compuestos de células hepáticas que suplen de manera parcial la actividad metabólica del hígado dañado pueden ser de diferente naturaleza. Inicialmente los más usados fueron los compuestos por hepatocitos porcinos, pero la posibilidad del contagio de zoonosis y las diferencias metabólicas existentes entre especies hace que no sean las ideales. Actualmente se investigan dispositivos compuestos por células procedentes de líneas tumorales o de células madre. El principal problema de las líneas celulares radica en su incapacidad para el desarrollo de todas las funciones metabólicas, mientras que las derivadas



de células madres tras su diferenciación alcanzan un mayor grado de funcionalidad, lo que supone una ventaja a la hora de ser usadas en terapias de sustitución hepática.

Una vez llegados a un estadio avanzado en el que sólo es posible el trasplante, la generación de órganos *in vitro* supone un campo prometedor. La obtención de matrices extracelulares (ECM), ya sea mediante técnicas de descelurización o *bioprinting* (proceso de impresión que permite la creación de estructuras biológicas de soporte, similares a la matriz extracelular) y la posterior implantación de tipos celulares en sus localizaciones permite la creación de órganos artificiales. En la generación de los diferentes tipos celulares juegan un importante papel las iPSC, ya que al ser pluripotenciales permiten la obtención de la mayoría de los linajes celulares implicados. En este caso, el principal inconveniente se encuentra en la dificultad para situar las células en el mismo lugar que en el órgano original, así como para garantizar su correcto desarrollo y funcionalidad.

## **7.-CONCLUSIÓN**

Las enfermedades crónicas hepáticas suponen un problema sanitario global, causando una elevada morbilidad y mortalidad. En este contexto las iPSC se muestran como una alternativa a las terapias tradicionales, con potencial para revolucionar el abordaje actual de estas patologías. Sin embargo, debemos ser prudentes con estas nuevas terapias debido a que aún se encuentran en un estado de investigación inicial, presentando un amplio abanico de inconvenientes que aún quedan por resolver. En definitiva, consideramos necesario apostar de manera decidida por la investigación y el desarrollo de nuevas terapias celulares que puedan reducir a la mínima expresión el importante impacto de las patologías crónicas hepáticas.

## **8.-BIBLIOGRAFÍA**

1. Ananthakrishnan A, Gogineni V, Saeian K. Epidemiology of primary and secondary liver cancers. *Semin Intervent Radiol* [Internet]. 2006;23(1):47–63.
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095–128.
3. Buchanan P, Dzebisashvili N, Lentine KL, Axelrod DA, Schnitzler MA, Salvalaggio PR. Liver Transplantation Cost in the Model for End- Stage Liver Disease Era: Looking Beyond the Transplant Admission. *Liver Transplant*. 2009;15(3):1270–7.

4. Cooper DK. A brief history of cross-species organ transplantation. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2012;25(1):49–57
5. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Lehec SC, Hughes R.D. Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transpl*. 2010;16:229–237.
6. LeCluyse EL. Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur. J. Pharm. Sci*. 2001;13:343–368.
7. Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, Piscaglia AC, Gasbarrini GB, D’Ugo DM, et al. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury. *J Biomed Biotechnol*. 2011;
8. Yagi H, Parekkadan B, Suganuma K, et al. Long-term superior performance of a stem cell/hepatocyte device for the treatment of acute liver failure. *Tissue Engineering Part A*. 2009;15(11):3377–3388.
9. Zacharias DG, Nelson TJ, Mueller PS, Hook CC. The science and ethics of induced pluripotency: what will become of embryonic stem cells?. *Mayo Clin Proc*. 2011; 86(7):634-40
10. Bayo J, Marrodon M, Aquino JB, Silva M, Garcia MG, Mazzolini G. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2014;34(3):330–42.
11. Gerbal-Chaloin S, Funakoshi N, Caillaud A, Gondeau C, Champon B, Si-Tayeb K. Human induced pluripotent stem cells in hepatology: beyond the proof of concept. *Am J Pathol. American Society for Investigative Pathology*; 2014;184(2):332–47.
12. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2009; 27: 743-745
13. Schwartz RE, Fleming HE, Khetani SR, Bhatia SN. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells.. *Biotechnology Advances*. 2012; 23(2): 504–513
14. Hansel MC, Davila JC, Vosough M, Gramignoli R, Skvorak KJ, Dorko K et al. The Use of Induced Pluripotent Stem Cells for the Study and Treatment of Liver Diseases. *Curr Protoc Toxicol*. 2016; 67:14-27
15. Yu Y, Wang X, Nyberg SL. Potential and Challenges of Induced Pluripotent Stem Cells in Liver Diseases Treatment. *J Clin Med*. 2014;3(3):997-1017
16. Monga Singh SP. Exploiting the Liver’s Will to Live. *The American Journal of Pathology*. 2014;184(2)
17. Subba Rao M, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Thinking outside the liver: Induced pluripotent stem cells for hepatic applications. *World J Gastroenterol*. 2013;19(22):3385-96
18. Lüningschrör P, Hauser S, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. MicroRNAs un pluripotency, reprogramming and cell fate induction. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(8):1894-903
19. Martí M, Mulero L, Pardo C, Morera C, Carrió M, Laricchia-Robbio L et al. Characterization of pluripotent stem cells. *Nature protocols*. 2013; 8(2):223-53

20. Sauer V, Roy-Chowdhury N, Guha C, Roy-Chowdhury J. Induced pluripotent stem cells as a source of hepatocytes. *Curr Pathobiol Rep.* 2014;2(1):11-20
21. Morrison GM, Oikonomopoulou I, Migueles RP, Soneji S, Livigni A, Enver T et al. Anterior definitive endoderm from ESC reveals a role for FGF signaling. *Cell Stem Cell.* 2008;3(4):402-415
22. Carpentier A, Nimgaonkar I, Chu V, Xia Y, Hu Z, Liang J. Hepatic differentiation of human pluripotent stem cells in miniaturized format suitable for high-throughput screen. *Stem Cell Research.* 2016;16:640-650
23. Handa K, Matsubara K, Fukumitsu K, Guzman-Lepe J, Watson A, Soto-Gutierrez A. Assembly of human organs from stem cells to study liver disease. *Am J Pathol.* 2014; 184(2):348-57
24. Irfan A, Ahmed I. Could Stem Cell Therapy be the Cure in Liver Cirrhosis?. *J Clin Exp Hepatol.* 2015;5(2):142-6
25. Moslem M, Valojerdi MR, Pournasr B, Muhammadnejad A, Baharvand H. Therapeutic potential of human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells in mice with lethal fulminant hepatic failure. *Cell Transplant.* 2013;22(10):1785-99.
26. Nagamoto Y, Takayama K, Ohashi K, Okamoto R, Sakurai F, Tachibana M et al. Transplantation of a human iPSC-derived hepatocyte sheet increases survival in mice with acute liver failure. *J Hepatol.* 2016;64(5):1068-75
27. Zhang Z, Wang FS. Stem cell therapies for liver failure and cirrhosis. *J Hepatol.* 2013;59(1):183-5
28. Yu Y, Fisher JE, Lillegard JB, Rodysill B, Amiot B, Nyber SL. Cell therapies for liver diseases. *Liver Transpl.* 2012;18(1):9-21
29. Espejel S, Rol GR, McLaughlin KJ, Lee AY, Zhang JY, Laird DJ et al. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes have the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(9):3120-6
30. Mobarra N, Soleimani M, Kouhkan F, Hesari Z, Lahmy R, Mossahebi-Mohammadi et al. Efficient differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cell (hiPSC) Derived Hepatocyte-Like Cells on hMSCs Feeder. *IJHOSCR.* 2014;8(4):20-29
31. Asgari S, Moslem M, Bagheri-Lankarani, K. Pournasr, B. Miryounesi, M. Baharvand, H. Differentiation and transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev.* 2013. 9(4):493–504
32. Shi X, Lv S, He X, Liu X, Sun M, Li M et al. Differentiation of hepatocytes from induced pluripotent stem cells derived from human hair follicle mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2016.
33. Choi SM, Kim Y, Liu H, Chaudhari P, Ye Z, Jang YY. Liver engraftment potential of hepatic cells derived from patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Cycle.* 2012;10(15):2423–2427

34. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010;467(7313):285-90
35. Kamada M, Mitsui Y, Matsuo T, Takahashi T. Reversible transformation and de-differentiation of human cells derived from induced pluripotent stem cell teratomas. *Hum Cell*. 2016;29(1):1-9
36. Rashid ST, Corbineau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2010; 120(9): 3127-3136
37. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE et al. Targeted gene correction of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 478(7369):391-4
38. Faulk DM, Wildemann JD, Badylak SF. Decellurization and cell seeding of whole liver biologic scaffolds composed of extracellular matrix. *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5(1):69-80
39. Gu J, Shi X, Ren H, Xu Q, Wang J, Xiao J et al. Systematic review: extracorporeal bio-artificial liver-support system for liver failure.
40. Wu YM, Huang YJ, Chen P, Hsu YC, Lai H et al. Hepatocyte-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells produce functional coagulation factor IX in a hemophilia B mouse model. *Cell Transplant*. 2015.
41. Wittebole X, Castanares-Zapatero D, Collienne C, Ciccarelli O, Hantson P, Laterre PF. Artificial Liver Support. En: Orlando G. *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. 1<sup>o</sup> edición. Elsevier. 2014. p.313-326
42. Lee SY, Kim HJ, Choi D. Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering alternatives to liver transplantation. *Int J Stem Cells*. 2015;8(1):36-47
43. Vacanti JP, Kulig KM. Liver cell therapy and tissue engineering for transplantation. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2014;23:150-155
44. Hernanda PY, Pedroza-Gonzalez A, Sprengers D, Peppelenbosch MP, Pan Q. Multipotent mesenchymal stromal cells in liver cancer: Implications for tumor biology and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1846:439-445
45. Johann PD, Muller I. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: Possible Culprits in Solid Tumors?. *Stem Cells International*. 2015.